

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 8 月 7 日 (07.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/064672 A1

(51) 国際特許分類: **C12P 21/02**, C12N 15/00
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00975
(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 31 日 (31.01.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2002-23141 2002 年 1 月 31 日 (31.01.2002) JP
(71) 出願人 および
(72) 発明者: 遠藤 弥重太 (ENDO, Yaeta) [JP/JP]; 〒791-8016
愛媛県 松山市 久万ノ台 4 7 8-1 7 Ehime (JP).
(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044
大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).

DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

(54) Title: CELL EXTRACT FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、及びその製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of preparing a high-performance cell extract for a cell-free protein synthesis reaction which comprises eliminating a low-molecular weight substance having an activity of inhibiting the protein synthesis from a cell extract having a cell-free protein synthesis activity by dialysis, gel-filtration, ultrafiltration or the like; and a readymade cell extract for cell-free protein synthesis using the same. By effecting the elimination of the low-molecular weight substance inhibiting the protein synthesis in the co-existence of ATP, GTP or an amino acid, the formation of insoluble substances can be prevented and thus the cell extract can be stabilized.

(57) 要約:

本発明は、無細胞タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から、透析、ゲルろ過、または限外ろ過等の方法によりタンパク質合成を阻害する活性を有する低分子物質を排除することを含む、高性能な無細胞タンパク質合成反応用細胞抽出液の調製法、およびこれを利用した無細胞タンパク質合成用レディーメイド型細胞抽出液を提供する。さらに当該低分子のタンパク質合成阻害物質を排除する工程を ATP、GTP、あるいはアミノ酸の共存下で行うことによって不溶性物質の生成を抑え該細胞抽出液を安定化することができる。



WO 03/064672 A1

明細書

無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、及びその製造方法

技術分野

本発明は、タンパク質合成反応活性の促進された無細胞タンパク質合成に用い
5 られる細胞抽出液、およびその製造方法等に関するものである。

背景技術

タンパク質を自由自在に合成する技術を開発することは、生命科学やバイオテ
クノロジー分野のみならず、ナノマシーンの設計や、ニューラルコンピューター
等工学分野における分子素子の開発に大きく貢献することが期待される。現在、
10 タンパク質の合成にはクローン化したDNAを生細胞に導入する遺伝子工学的の手
法が広く利用されているが、この方法で生産可能な外来性タンパク質は宿主の生
命維持機構をくぐり抜けられる分子種に限られてしまう。一方、有機合成技術の
進展によって自動合成機が普及し、数十個のアミノ酸から成るペプチドを合成す
ることは日常的となっているが、分子量のより大きなタンパク質を化学的に合成
15 することは収率や副反応等の限界から現在においてもきわめて困難である。さら
に欧米では、生体をそのまま利用する従来型のタンパク質生産や新規分子探索方
法に対する倫理的な批判が強く、国際的な規制がさらに厳しくなる懸念もある。

このような問題点を打破する新しいタンパク質合成法として、化学的手法を取り
入れ、生物体の優れた特性を最大限に利用しようとする、無細胞タンパク質合
20 成法を挙げることができる。この方法は、生体の遺伝情報の翻訳系を人工容器内
に取り揃え、設計・合成した核酸を鋳型として、非天然型をも含む望みのアミノ
酸を取り込むことのできる系を再構築するというものである。このシステムでは、
生命体の制約を受けることがないので、合成可能なタンパク質分子種を殆ど無限
大にまで広げることが期待できる。

25 無細胞タンパク質合成系については、すり潰した細胞液にタンパク質合成能が
残存することが40年前に報告されて以来、種々の方法が開発され、大腸菌、コ
ムギ胚芽、ウサギ網状赤血球由来の細胞抽出液はタンパク質合成等に現在も広く

利用されている。無細胞系における翻訳速度は *in vivo* とほぼ同等で、10ペプチド結合／秒であり高速性および翻訳の正確性にも優れた反応特性を発揮するものの、いずれの無細胞系においても合成持続時間が短く、得られる収量は反応容量1ml当り数 μ g乃至数十 μ gで生細胞の1／100から1／1000程度と極端に低く、タンパク質の合成法としては実用的でなかった。

従来の無細胞タンパク質合成系の最大の欠点は、合成効率がきわめて低いことであるが、この原因について正面から研究されたことはなかった。細胞を物理的に破碎し、人工の緩衝液で調製した細胞抽出液中の活性が少々低いのは生化学分野ではごく常識のことであったからである。

- 10 先に発明者らは、これまでのリボソーム不活性化毒素の研究から得た知見をもとに、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系に見られる極端なタンパク質合成活性の低下現象が対病原微生物防御機構として本来細胞にプログラムされた自己リボソームの不活性化機構（細胞自殺機構）のスイッチが、胚芽破碎が引き金となって起動することに起因することを明らかにしている(Madin, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564 (2000))。そして、トリチン活性などを胚芽組織から排除する新規方法で調製したコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成反応が長時間に渡って高いタンパク質合成特性を発揮するようになることを実証した(Madin, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564 (2000)、特開2000-236896号公報)。

しかしながら、このような方法により調製されたコムギ胚芽抽出液でも、他の阻害因子の影響により目的とするタンパク質（例えば転写因子等のDNA結合タンパク質等）によっては必ずしも十分な収量が得られない等の問題があった。

- 25 また、従来の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、タンパク質合成に必要なアミノ酸、エネルギー源やイオン等を含む溶液を添加するとその保存性に問題が生じていた。そのため細胞抽出液とエネルギー源等を含む溶液は別々に提供されており、実験者はそれらを実験の都度に翻訳鋳型とともに混合する必要があった。

- またその操作は低温で行う必要があること等から実験操作全体が煩雑となり、しばしばタンパク質合成の失敗の原因となっていた。さらにこのような無細胞タンパク質合成反応用試薬の提供方法は、多数の遺伝子からのタンパク質の網羅的合成には不向きであり、将来のロボット化に向けてこのような煩雑さといった欠点
- 5 は解消しなければならない最大の課題であった。

発明の開示

- 本発明は、無細胞タンパク質合成反応において、その工程の煩雑さ、あるいは目的とするタンパク質合成活性の低さを改善するために、タンパク質合成活性の促進された細胞抽出液を提供すること、さらにはコムギ胚芽無細胞タンパク質合成に当たって反応混液の調製を必要とせず、目的とする翻訳鋳型 (mRNA) を
- 10 添加するだけで、遺伝子産物の機能・構造の解析のための網羅的タンパク質合成や大量合成を簡便且つ効率的に可能とする保存性の高い細胞抽出液 (すなわち、レディーメイド型細胞抽出液) を提供することを課題とする。

- 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、コムギ胚芽抽出液を排除分子量 12,000~14,000 ダルトン程度の再生セルロース膜を用い、
- 15 透析を行うことによって、該抽出液から低分子物質を取り除いたところ、該細胞抽出液のタンパク質合成活性が著しく促進されることを見出した。さらに、当該低分子物質の透析法による排除を、無細胞タンパク質合成に必要な成分のうち翻訳鋳型を除く全てを含む溶液中で行ったところ、処理後の細胞抽出液は、従来の
- 20 細胞抽出液よりもタンパク質合成活性が促進されていた。またこれを -80℃ で 4 週間保存した後にもそのタンパク質合成活性は低下することがなかったため、これをレディーメイド型細胞抽出液として用い得ることが判った。

本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

すなわち、本発明によれば、

- 25 (1) タンパク質合成活性を有し、且つ低分子のタンパク質合成阻害物質を含まないことを特徴とする、細胞抽出液、
- (2) 低分子のタンパク質合成阻害物質が、排除分子量 12,000~14,000

00ダルトンの再生セルロース膜を用いた透析によって除去され得るものである、
上記（１）記載の細胞抽出液、

（３）低分子のタンパク質合成阻害物質が分子量14,000ダルトン以下のタンパク質合成阻害物質である、上記（１）記載の細胞抽出液、

5 （４）不溶性物質を実質的に含まない上記（１）～（３）のいずれか１項に記載の細胞抽出液、

（５）細胞抽出液がコムギ胚芽抽出液であることを特徴とする上記（１）～（４）のいずれか１項に記載の細胞抽出液、

（６）タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から低分子のタンパク質合成阻害物質を排除することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造方法、
10

（７）低分子のタンパク質合成阻害物質が、排除分子量12,000～14,000ダルトンの再生セルロース膜を用いた透析によって除去され得るものである、
上記（６）記載の方法、

（８）低分子のタンパク質合成阻害物質が分子量14,000ダルトン以下のタンパク質合成阻害物質である、上記（６）記載の方法、
15

（９）細胞抽出液がコムギ胚芽抽出液であることを特徴とする上記（６）～（８）のいずれか１項に記載の方法、

（１０）タンパク質合成阻害物質の排除が、透析により行われることを特徴とする上記（６）～（９）のいずれか１項に記載の方法、

20 （１１）タンパク質合成阻害物質の排除が、少なくとも高エネルギーリン酸化合物を含む溶液中で行われることを特徴とする上記（６）～（１０）のいずれか１項に記載の方法、

（１２）タンパク質合成阻害物質の排除が、翻訳鋳型を除く無細胞タンパク質合成に必須の成分を含む溶液中で行われることを特徴とする上記（６）～（１１）

25 のいずれか１項に記載の方法、

（１３）タンパク質合成に必須の成分が、無細胞タンパク質合成反応を行い得る濃度で溶液中に含まれていることを特徴とする上記（１２）記載の方法、

(14) 上記(6)～(13)のいずれか1項に記載の方法によって製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、

(15) 上記(1)～(5)、および(14)のいずれか1項に記載の細胞抽出液を用いることを特徴とするタンパク質合成方法、

5 (16) 少なくとも上記(1)～(5)、および(14)のいずれか1項に記載の細胞抽出液を含むことを特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット、

(17) 上記(15)に記載の方法または上記(16)に記載のキットを用いることによって取得されたタンパク質、
が提供される。

10 図面の簡単な説明

図1は、コムギ胚芽抽出液の透析による不溶性物質の生成と、ATPによるその阻止作用を示す図である。

図2は、ATPの非存在、存在下における透析膜内の可溶性タンパク質と不溶性タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分
15 析結果を示す電気泳動像である。

図3は、ATPの非存在下、または存在下で透析を行って得られた細胞抽出液(透析処理後)のタンパク質合成活性を示す図である。

図4は、透析によって生成した不溶性物質中の核酸成分、特にRNAの定量、定性分析結果を示すグラフ、および電気泳動像である。

20 図5は、透析処理後の不溶性物質中の核酸成分(RNA)の定量と、可溶性画分のタンパク質合成活性を示す図である。

図6は、バッチ法による安定化成分の添加のタンパク質合成活性に与える効果を示す図である。

図7は、細胞抽出液を透析処理することによるタンパク質合成促進効果の温度
25 依存性を示す図である。

図8は、コムギ胚芽に含まれる、セファデックスG25カラムにより分画される物質のタンパク質合成阻害作用を示す図である。

図9は、レディーメイド型のコムギ胚芽由来細胞抽出液の性能を示す図、および電気泳動像である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

5 (1) 無細胞タンパク質合成を阻害する低分子物質の排除

本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の調製に用いられる細胞抽出液としては、無細胞タンパク質合成系においてタンパク質合成能を有するものであれば如何なるものであってもよい。ここで、無細胞タンパク質合成系とは、細胞内に備わるタンパク質翻訳装置であるリボソーム等を含む成分を生物体から抽出し、

- 10 この抽出液に転写、または翻訳鋳型、基質となる核酸、アミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、およびその他の有効因子を加えて試験管内で行う方法である。このうち、鋳型としてRNAを用いるもの（これを以下「無細胞翻訳系」と称することがある）と、DNAを用い、RNAポリメラーゼ等転写に必要な酵素をさらに添加して反応を行うもの（これを以下「無細胞転写／翻訳系」と称することがある）がある。本発明における無細胞タンパク質合成系は、上記の無細胞翻訳系、無細胞転写／翻訳系のいずれをも含む。
- 15

本発明に用いられる細胞抽出液として具体的には、大腸菌、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等の既知のものが用いられる。これらは市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液は、

- 20 P r a t t , J . M . e t a l . , T r a n s c r i p t i o n a n d T r a n s l a t i o n , H a m e s , 1 7 9 - 2 0 9 , B . D . & H i g g i n s , S . J . , e d s , I R L P r e s s , O x f o r d . (1 9 8 4) に記載の方法等に準じて調製することもできる。

- 市販の細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E . c o l i S 3 0 e
25 x t r a c t s y s t e m (P r o m e g a 社製) と R T S 5 0 0 R a p i d T r a n s l a t i o n S y s t e m (R o c h e 社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものは R a b b i t R e t i c u l o c y t e L y

s a t e S y s t e m (P r o m e g a 社製) 等、さらにコムギ胚芽由来のものは P R O T E I O S TM (T O Y O B O 社製) 等が挙げられる。このうち、植物種子の胚芽抽出液を用いることが好ましく、植物種子としては、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物のものが好ましい。本発明の細胞抽出液として、このうちコムギ胚芽抽出液を用いたものが好適である。

コムギ胚芽抽出液の作製法としては、例えば J o h n s t o n , F . B . e t a l . , N a t u r e , 1 7 9 , 1 6 0 - 1 6 1 (1 9 5 7)、あるいは E r i c k s o n , A . H . e t a l . , (1 9 9 6) M e t h . I n E n z y m o l . , 9 6 , 3 8 - 5 0 等に記載の方法を用いることができるが、以下にさらに詳細に説明する。

通常、胚芽の部分は非常に小さいので胚芽を効率的に取得するためには胚芽以外の部分をできるだけ除去しておくことが好ましい。通常、まず、植物種子に機械的な力を加えることにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得、該混合物から、胚乳破碎物、種皮破碎物等を取り除いて粗胚芽画分（胚芽を主成分とし、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物）を得る。植物種子に加える力は、植物種子から胚芽を分離することができる程度の強さであればよい。具体的には、公知の粉碎装置を用いて、植物種子を粉碎することにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得る。

植物種子の粉碎は、通常公知の粉碎装置を用いて行うことができるが、ピンミル、ハンマーミル等の被粉碎物に対して衝撃力を加えるタイプの粉碎装置を用いることが好ましい。粉碎の程度は、使用する植物種子胚芽の大きさに応じて適宜選択すればよいが、例えばコムギ種子の場合は、通常、最大長さ 4 mm 以下、好ましくは最大長さ 2 mm 以下の大きさに粉碎する。また、粉碎は乾式で行うのが好ましい。

次いで、得られた植物種子粉碎物から、通常公知の分級装置、例えば、篩を用いて粗胚芽画分を取得する。例えば、コムギ種子の場合、通常、メッシュサイズ 0 . 5 mm ~ 2 . 0 mm、好ましくは 0 . 7 mm ~ 1 . 4 mm の粗胚芽画分を取

得する。さらに、必要に応じて、得られた粗胚芽画分に含まれる種皮、胚乳、ゴミ等を風力、静電気力を利用して除去してもよい。

また、胚芽と種皮、胚乳の比重の違いを利用する方法、例えば重液選別により、粗胚芽画分を得ることもできる。より多くの胚芽を含有する粗胚芽画分を得るために、上記の方法を複数組み合わせてもよい。さらに、得られた粗胚芽画分から、例えば目視や色彩選別機等を用いて胚芽を選別する。

このようにして得られた胚芽画分は、胚乳成分が付着している場合があるため、通常胚芽純化のために更に洗浄処理することが好ましい。洗浄処理としては、通常10℃以下、好ましくは4℃以下に冷却した水または水溶液もしくは界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させ、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することが好ましい。また、通常10℃以下、好ましくは4℃以下で、界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することがより好ましい。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましく、非イオン性界面活性剤であるかぎり、広く利用ができる。具体的には、例えば、好適なものとして、ポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ (B r i j)、トリトン (T r i t o n)、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0、ツイーン (T w e e n) 等が例示される。なかでも、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0 が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、胚乳成分の除去に十分且つ胚芽成分のタンパク質合成活性に悪影響を及ぼさない濃度で使用され得るが、例えば0.5%の濃度で使用する事ができる。水または水溶液による洗浄処理および界面活性剤による洗浄処理は、どちらか一方でもよいし、両方実施してもよい。また、これらの洗浄処理は、超音波処理との組み合わせで実施してもよい。

本発明においては、上記のように植物種子を粉碎して得られた粉碎物から植物胚芽を選別した後洗浄して得られた無傷（発芽能を有する）の胚芽を（好ましくは抽出溶媒の存在下に）細分化した後、得られるコムギ胚芽抽出液を分離し、更に精製することにより無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出液を得る。

抽出溶媒としては、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオンおよび／ま

たはチオール基の酸化防止剤を含む水溶液を用いることができる。また、必要に応じて、カルシウムイオン、L型アミノ酸等をさらに添加してもよい。例えば、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（HEPES）-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、L型アミノ酸および／または

5 ジチオスレイトールを含む溶液や、Pattersonらの方法を一部改変した溶液（HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、L型アミノ酸および／またはジチオスレイトールを含む溶液）を抽出溶媒として使用することができる。抽出溶媒中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用のコムギ胚芽抽出液の製造法に用いられるものを採用す

10 ればよい。

胚芽と抽出に必要な量の抽出溶媒とを混合し、抽出溶媒の存在下に胚芽を細分化する。抽出溶媒の量は、洗浄前の胚芽1gに対して、通常0.1ミリリットル以上、好ましくは0.5ミリリットル以上、より好ましくは1ミリリットル以上である。抽出溶媒量の上限は特に限定されないが、通常、洗浄前の胚芽1gに対して、

15 10ミリリットル以下、好ましくは5ミリリットル以下である。また、細分化しようとする胚芽は従来のように凍結させたものを用いてもよいし、凍結させていないものを用いてもよいが、凍結させていないものを用いるのがより好ましい。

細分化の方法としては、摩砕、圧砕等粉砕方法として従来公知の方法を採用す

20 ることができるが、本発明者が開発した衝撃または切断により胚芽を細分化する方法（特願2002-023139）が好ましい。ここで、「衝撃または切断により細分化する」とは、植物胚芽の細胞核、ミトコンドリア、葉緑体等の細胞小器官（オルガネラ）、細胞膜や細胞壁等の破壊を、従来の摩砕または圧砕と比べて最小限に止めうる条件で植物胚芽を破壊することを意味する。

25 細分化する際に用いることのできる装置や方法としては、上記条件を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、ワーリングブレンダーのような高速回転する刃状物を有する装置を用いることが好ましい。刃状物の回転数は、通常1

000rpm以上、好ましくは5000rpm以上であり、また、通常3000rpm以下、好ましくは25000rpm以下である。刃状物の回転時間は、通常5秒以上、好ましくは10秒以上である。回転時間の上限は特に限定されないが、通常10分以下、好ましくは5分以下である。細分化する際の温度は、好ましくは10℃以下で操作が可能な範囲内、特に好ましくは4℃程度が適当である。

このように衝撃または切断により胚芽を細分化することにより、胚芽の細胞核や細胞壁を全て破壊してしまうのではなく、少なくともその一部は破壊されることなく残る。即ち、胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁が必要以上に破壊されることがないため、それらに含まれるDNAや脂質等の不純物の混入が少なく、細胞質に局在するタンパク質合成に必要なRNAやリボソーム等を高純度で効率的に胚芽から抽出することができる。

このような方法によれば、従来の植物胚芽を粉碎する工程と粉碎された植物胚芽と抽出溶媒とを混合してコムギ胚芽抽出液を得る工程とを同時に一つの工程として行うことができるため効率的にコムギ胚芽抽出液を得ることができる。上記の方法を、以下、「ブレンダー法」と称することがある。

このような植物胚芽の細分化、特に衝撃または切断による細分化は、抽出溶媒の存在下に行うことが好ましいが、細分化した後に抽出溶媒を添加することもできる。

次いで、遠心分離等によりコムギ胚芽抽出液を回収し、ゲルろ過等により精製することによりコムギ胚芽抽出液を得ることができる。ゲルろ過としては、例えば予め適当な溶液で平衡化しておいたゲルろ過装置を用いて行うことができる。ゲルろ過溶液中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク合成用のコムギ胚芽抽出液の製造法に用いられるもの（例えば、HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオスレイトールまたはL型アミノ酸を含む溶媒）を採用すればよい。

好ましくはこのようにして得られた細胞抽出液は、RNase活性およびホス

ファターゼ活性が極めて低減されたものである。

ゲルろ過後の胚芽抽出物含有液には、微生物、特に糸状菌（カビ）などの孢子が混入していることがあり、これら微生物を排除しておくことが好ましい。特に長期（1日以上）の無細胞タンパク質合成反応中に微生物の繁殖が見られることがあるので、これを阻止することは重要である。微生物の排除手段は特に限定されないが、ろ過滅菌フィルターを用いるのが好ましい。フィルターのポアサイズとしては、混入の可能性のある微生物が除去可能なものであれば特に制限はないが、通常0.1～1マイクロメートル、好ましくは0.2～0.5マイクロメートルが適当である。ちなみに、小さな部類の枯草菌の孢子のサイズは0.5 μm x 1 μm であることから、0.20マイクロメートルのフィルター（例えば Sartorius 製の MinisartTM等）を用いるのが孢子の除去にも有効である。ろ過に際して、まずポアサイズの大きめのフィルターでろ過し、次に混入の可能性のある微生物が除去可能であるポアサイズのフィルターを用いてろ過するのが好ましい。

15 このようにして得られた細胞抽出液は、原料細胞自身が含有するまたは保持するタンパク質合成機能を抑制する物質（トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等の、mRNA、tRNA、翻訳タンパク質因子やリボソーム等に作用してその機能を抑制する物質）を含む胚乳がほぼ完全に除去され純化されている。ここで、胚乳がほぼ完全に除去され純化されているとは、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度まで胚乳部分を取り除いたコムギ胚芽抽出液のことであり、また、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度とは、リボソームの脱アデニン化率が7%未満、好ましくは1%以下になっていることをいう。

20 このような細胞抽出液は、上記の好ましい細分化方法を用いた場合でも低分子のタンパク質合成阻害物質（以下、これを「低分子合成阻害物質」と称することがある）をある程度含有しているため、細胞抽出液の構成成分から、これら低分子合成阻害物質を分子量の違いにより分画排除する。排除されるべき物質（低分子合成阻害物質）の分子量は、細胞抽出液中に含まれるタンパク質合成に必要な

因子よりも小さいものであればよいが、後述するように当該低分子合成阻害物質を排除するのにどのような方法を用いるかによって変わり得る。例えば排除分子量が12,000～14,000ダルトン程度の再生セルロース膜を用いた透析によって低分子合成阻害物質を排除する場合には、当該透析により排除される物質の分子量であって、具体的には分子量50,000～14,000ダルトン以下、好ましくは14,000ダルトン以下が例示される。

低分子合成阻害物質の細胞抽出液からの排除方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が用いられるが、具体的には透析膜を介した透析による方法、ゲルろ過法、あるいは限外ろ過法等が挙げられる。本発明において低分子合成阻害物質を「含まない」とは、上記した種々の方法によって低分子合成阻害物質を排除する処理を行ったのと同程度にまで、該低分子合成阻害物質が含まれていないことを意味し、排除されたか否かは、得られる細胞抽出液のそのタンパク質合成活性の高さでもって確認することができる。

透析による方法（透析法）が、透析内液に対しての物質の供給のし易さ等の点において好ましい。以下、透析法を用いる場合を例に詳細に説明する。

透析に用いる透析膜としては、50,000～12,000ダルトンの排除分子量を有するものが挙げられる、具体的には排除分子量12,000～14,000ダルトンの再生セルロース膜（Viskase Sales, Chicago製）や、排除分子量50,000のスペクトラ／ポア6（SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA製）等が好ましく用いられる。このような透析膜中に適当な量の上記細胞抽出液を入れ常法を用いて透析を行う。透析を行う時間は、30分～24時間程度が好ましい。

（2）不溶性物質の生成阻害（細胞抽出液の安定化）

低分子合成阻害物質の排除を行う際、細胞抽出液に不溶性物質が生成される場合には、これを阻害する（以下、これを「細胞抽出液の安定化」と称することがある）ことにより、最終的に得られる細胞抽出液（以下、これを「処理後細胞抽出液」と称することがある）のタンパク質合成活性が高まる。ここで不溶性物質

とは、低分子合成阻害物質の排除工程にある細胞抽出液を適当な条件、具体的には遠心分離やろ過等、特に10,000～80,000×g、好ましくは30,000×g程度、5～60分間、好ましくは20分間程度の遠心分離によって沈殿として回収される物質である。

- 5 細胞抽出液の安定化の具体的な方法としては、上記(1)に記載した低分子合成阻害物質の排除を行う際に、少なくとも高エネルギーリン酸化合物、例えばATPまたはGTP等を含む溶液で行う方法が挙げられる。高エネルギーリン酸化合物としては、ATPが好ましく用いられる。また、好ましくは、ATPとGTP、さらに好ましくはATP、GTP、および20種類のアミノ酸を含む溶液
10 中で行う。

- これらの成分(以下、これを「安定化成分」と称することがある)を含む溶液中で低分子合成阻害物質の排除を行う場合は、細胞抽出液に予め安定化成分を添加し、インキュベートした後、これを低分子合成阻害物質の排除工程に供してもよい。低分子合成阻害物質の排除に透析法を用いる場合は、細胞抽出液だけでなく
15 透析外液にも安定化成分を添加して透析を行い低分子合成阻害物質の排除を行うこともできる。透析外液にも安定化成分を添加しておけば、透析中に安定化成分が分解されても常に新しい安定化成分が供給されるのでより好ましい。このことは、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いる場合にも適用でき、それぞれの担体を安定化成分を含むろ過用緩衝液により平衡化した後に、安定化成分を含む細胞抽出
20 液を供し、さらに上記緩衝液を添加しながらろ過を行うことにより同様の効果を得ることができる。

- 安定化成分の添加量、および安定化処理時間としては、細胞抽出液の種類や調製方法により適宜選択することができる。これらの選択の方法としては、試験的に量および種類を種々に変えて安定化成分を細胞抽出液に添加し、適当な時間の
25 後に低分子合成阻害物質の排除工程を行い、取得された処理後細胞抽出液を遠心分離等の方法で可溶性画分と不溶性画分に分離し、そのうちの不溶性物質の生成が少ないものを選択する方法が挙げられる。さらには、取得された処理後細胞抽

出液を用いて無細胞タンパク質合成を行い、タンパク質合成活性の高いものを選択する方法も好ましい。また、上記の選択方法において、低分子合成阻害物質の排除工程として透析法を用いる場合、適当な安定化成分を透析外液にも添加し、これらを用いて透析を適当時間行った後、得られた細胞抽出液中の不溶性物質の

5 量や、得られた細胞抽出液のタンパク質合成活性等により選択する方法も挙げられる。安定化处理した細胞抽出液に含まれる不溶性物質の量としては、低減されていることが好ましい。

本発明の細胞抽出液において、不溶性物質を「実質的に含まない」とは、上記した種々の方法によって低分子合成阻害物質を排除する処理を行った細胞抽出液
10 と同程度にまで、不溶性物質が除去されていることを意味し、排除されているか否かは、得られる細胞抽出液のそのタンパク質合成活性の高さでもって確認することができる。

このようにして選択された細胞抽出液の安定化条件の例として、具体的には、
(1)に記載したブレンダー法を用いて調製したコムギ胚芽抽出液で、透析法に
15 より低分子合成阻害物質の排除工程を行う場合においては、そのコムギ胚芽抽出液、および透析外液中に、ATPとしては $100\mu\text{M}\sim 0.5\text{mM}$ 、GTPは $25\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ $25\mu\text{M}\sim 5\text{mM}$ 添加して30分～1時間以上の透析を行う方法等が挙げられる。透析を行う場合の温度は、タンパク質合成活性が失われず、かつ透析が可能な温度であれば如何なるも
20 のであってもよい。具体的には、最低温度としては、溶液が凍結しない温度で、通常 -10°C 、好ましくは -5°C 、最高温度としては透析に用いられる溶液に悪影響を与えない温度の限界である 40°C 、好ましくは 38°C である。

細胞抽出液への安定化成分の添加方法は、特に制限はなく、低分子合成阻害物質の排除工程の前に添加しこれを適当時間インキュベートして安定化を行った後、
25 低分子合成阻害物質の排除工程を行ってもよいし、安定化成分を添加した細胞抽出液、および／または安定化成分を添加した該排除工程に用いるための緩衝液を用いて低分子合成阻害物質の排除工程を行ってもよい。

本発明の細胞抽出液、好ましくは透析処理後の細胞抽出液、特に好ましくは、不溶性物質を実質的に含まない細胞抽出液は、いずれの状態でも保存可能であるが、特に低温、好ましくは -20°C 以下、より好ましくは -80°C 以下で保存し得る。また凍結乾燥状態による保存も特に好ましい。後述するが、レディーメイ
5 D型の細胞抽出液の場合、凍結乾燥状態で保存し、用時、溶解して翻訳鑄型を添加するだけでタンパク質合成を実施することが可能となるのでより好適な態様である。

(3) 無細胞タンパク質合成

かくして取得された低分子合成阻害物質が排除された細胞抽出液は、これをそ
10 れぞれ選択されたそれ自体既知のシステム、または装置に投入し、タンパク質合成を行うことができる。タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J. M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209; B. D. & Higgins, S. J., eds, IRL Press, Oxford (1984))
15 のように、該細胞抽出液に無細胞タンパク質合成に必要なエネルギー源やアミノ酸、あるいはtRNAを添加して行う方法や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin, A. S. et al., Science, 242, 1162-1164 (1988))、透析法 (木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法 (WO
20 00/68412) 等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鑄型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特開2000-333673公報: 以下これを「不連続ゲルろ過法」と称することがある) 等を用いることができる。

このうち、バッチ法ではタンパク質合成を長時間行うと反応が停止することが
25 あるため、後者のアミノ酸やエネルギー源の連続、または不連続供給系を使用することにより、反応を長時間維持させることができ、更なる効率化が可能となる。ここで、上記(1)に記載のブレンダー法によりコムギ胚芽抽出液を調製した場

合には tRNA を十分に含んでいるため通常これを添加する必要が無い。

- バッチ法によりタンパク質合成を行う場合には、例えば翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後に翻訳鋳型を添加してインキュベートすること等により行うことができる。コムギ胚芽抽出液を用いた場合、上記ブレインキュベートは 10～40℃で 5～10 分間、インキュベートは同じく 10～40℃、好ましくは 18～30℃、さらに好ましくは 20～26℃で行う。反応時間は、反応が停止するまでの時間であるが、バッチ法では通常 10 分～7 時間程度である。

- 透析法によりタンパク質合成を行う場合には、合成反応液を透析内液とし、透析外液と物質移動が可能な透析膜によって隔離される装置を用いて、タンパク質合成を行う。具体的には、例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加して、適当な透析容器に入れ反応内液とする。透析容器としては、底部に透析膜が付加されている容器（第一化学社製：透析カップ 12, 000 等）や、透析用チューブ（三光純薬社製：12, 000 等）が挙げられる。透析膜は、10, 000 ダルトン以上の分子量限界を有するものが用いられるが、12, 000 ダルトン程度の分子量限界を有するものが好ましい。

- 透析外液としては、上記合成反応液から翻訳鋳型を除いたものが用いられる。透析外液は反応速度が低下した時点で、新鮮なものと交換することにより透析効率を上昇させることができる。反応温度、および時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては通常 10～40℃、好ましくは 18～30℃、さらに好ましくは 20～26℃で 10 分～12 日間行うことができる。

- 重層法を用いてタンパク質合成を行う場合には、合成反応液を適当な容器に入れ、該溶液上に、上記透析法に記載した透析外液を界面を乱さないように重層することによりタンパク質合成を行う。具体的には例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加

して、適当な容器に入れ反応相とする。容器としては、例えばマイクロタイタープレート等が挙げられる。この反応相の上層に上記透析法に記載した透析外液(供給相)を界面を乱さないように重層して反応を行う。

- 両相の界面は必ずしも重層によって水平面状に形成させる必要はなく、両相を
- 5 含む混合液を遠心分離することによって、水平面を形成することも可能である。
- 両相の円形界面の直径が7 mmの場合、反応相と供給相の容量比は1 : 4 ~ 1 : 8が適当であるが、1 : 5が好適である。両相からなる界面面積は大きいほど拡散による物質交換率が高く、タンパク質合成効率が上昇する。従って、両相の容量比は、両相の界面面積によって変化する。合成反応は静置条件下で、反応温度、
- 10 および時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては10 ~ 40℃で、好ましくは18 ~ 30℃、さらに好ましくは20 ~ 26℃で、通常10 ~ 17時間行うことができる。また、大腸菌抽出液を用いる場合、反応温度は30 ~ 37℃が適当である。

- 不連続ゲルろ過法を用いてタンパク質合成を行う場合には、合成反応液により
- 15 合成反応を行い、合成反応が停止した時点で、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を供給し、合成物や分解物を排出することによりタンパク質合成を行う。
- 具体的には例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加して、適当な容器に入れ反応を行う。
- 容器としては、例えばマイクロプレート等が挙げられる。この反応下では、例え
- 20 ば容量の48%容のコムギ胚芽抽出液を含む反応液の場合には反応1時間で合成反応は完全に停止する。このことは、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定やショ糖密度勾配遠心法によるポリリボソーム解析 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564 (2000)) により確認することができる。
- 25 合成反応の停止した上記反応溶液を、予め上記透析法に記載の透析外液と同様の組成の供給液により平衡化したゲルろ過カラムに通す。このろ過溶液を再度適当な反応温度に保温することにより、合成反応が再開し、タンパク質合成は数時

間に渡って進行する。以下、この反応とゲルろ過操作を繰り返す。反応温度、および時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては26℃で約1時間ごとにゲルろ過を繰り返すのが好ましい。

- 5 かくして得られたタンパク質は、それ自体既知の方法により確認することができる。具体的には例えば、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定や、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離とクマシーブリリアントブルー (CBB) による染色、オートラジオグラフィー法 (Endo, Y. et al., J. Biotech., 25, 221-230 (1992); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564 (2000)) 等を用いること
10 ができる。

- また、かくして得られる反応液には、目的タンパク質が高濃度に含まれているので、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過等のそれ自体既知の分離、精製法により、該反応液から目的タンパク質
15 を容易に取得することができる。

(4) 無細胞タンパク質合成用レディーメイド型細胞抽出液

- 上記(1)、あるいは(2)の低分子合成阻害物質の排除工程、および該工程における細胞抽出液の安定化工程を、無細胞タンパク質合成に必要な成分のうち翻訳鋳型以外の全てを含む溶液中で行うことによりレディーメイド型細胞抽出液を
20 作製することができる。無細胞タンパク質合成に必要な成分のうち翻訳鋳型以外の全てとは、使用する細胞抽出液の由来によっても異なり、また、本発明の無細胞タンパク質合成が無細胞翻訳系であるのか、あるいは無細胞転写／翻訳系であるのかによっても異なる。コムギ胚芽の無細胞翻訳系の場合には、基質となるアミノ酸、エネルギー源 (ATPおよびGTP) を少なくとも含み、無細胞転写／
25 翻訳系の場合には上記成分に加え、基質となる核酸、RNAポリメラーゼを必要とする。具体的には、コムギ胚芽の無細胞翻訳系の場合には、好ましくは、基質となるアミノ酸、エネルギー源に加え、各種イオン、緩衝液、ATP再生系、核

酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5' - cAMP、葉酸塩、抗菌剤等のうちの1つ以上がさらに含まれる。具体的な濃度としては、ATPとしては100 μ M ~ 0.5 mM、GTPは25 μ M ~ 1 mM、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ25 μ M ~ 5 mMが好ましい。その他の各成分についても当分野で通常用いられる濃度で含まれる。ここで、細胞抽出液として上記(1)に記載したブレンダー法により調製したコムギ胚芽抽出液を用いる場合には、通常tRNAの添加は必要無い。

(5) 試薬、およびキット

- 本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、好ましくは処理後細胞抽出液、およびレディーメイド型細胞抽出液は、これを含む無細胞タンパク質合成反応用キットとして提供することができる。本発明のキットには、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液あるいは処理後細胞抽出液の場合には、これ以外に該タンパク質合成系に必須のあるいは適した成分、具体的には基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、ATP再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5' - cAMP、葉酸塩、抗菌剤等や、界面活性剤、RNAポリメラーゼ、陽性コントロール用翻訳鋳型核酸、翻訳鋳型を複製するためのベクター、反応容器等が含まれる。また、レディーメイド型細胞抽出液の場合には、上記のタンパク質合成系に必須の、あるいは適した成分は全て含まれているため、それ以外のものを含む。しかし、これら全ての試薬類を含む必要はなく、無細胞タンパク質合成に用い得るキットであれば如何なる試薬の組み合わせのものでもよい。

実施例

- 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1 コムギ胚芽抽出液の調製

北海道産チホクコムギ種子(未消毒)を1分間に100 gの割合でミル(F r

itsch社製：Rotor Speed Mill pulverisette 14型)に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に粉碎した。篩で発芽能を有する胚芽を含む画分(メッシュサイズ0.7~1.0mm)を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液(容量比=四塩化炭素：シクロヘキサン=2.4：1)を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。

次に、ベルト式色彩選別機BLM-300K(製造元：株式会社安西製作所、発売元：株式会社安西総業)を用いて、次の通り、色彩の違いを利用して粗胚芽画分から胚芽を選別した。この色彩選別機は、粗胚芽画分に光を照射する手段、粗胚芽画分からの反射光および/または透過光を検出する手段、検出値と基準値とを比較する手段、基準値より外れたものまたは基準値内のものを選別排除する手段を有する装置である。

色彩選別機のベルト上に粗胚芽画分を1000乃至5000粒/m²となるように供給し、ベルト上の粗胚芽画分に蛍光灯で光を照射して反射光を検出した。ベルトの搬送速度は、50m/分とした。受光センサーとして、モノクロのCCDラインセンサー(2048画素)を用いた。

まず、胚芽より色の黒い成分(種皮等)を排除するために、ベージュ色のベルトを取り付け、胚芽の輝度と種皮の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。次いで、胚乳を選別するために、濃緑色のベルトに取り替えて、胚芽の輝度と胚乳の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。吸引は、搬送ベルト上方約1cm位置に設置した吸引ノズル30個(長さ1cm当たり吸引ノズル1個並べたもの)を用いて行った。

この方法を繰り返すことにより胚芽の純度(任意のサンプル1gあたりに含まれる胚芽の重量割合)が98%以上になるまで胚芽を選別した。

得られたコムギ胚芽画分を4℃の蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄

液が白濁しなくなるまで洗浄した。次いで、ノニデット (Nonidet : ナカライ・テクトニクス社製) P40 の 0.5 容量% 溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄してコムギ胚芽を得、以下の操作を 4℃で行った。

- 5 洗浄した胚芽湿重量に対して 2 倍容量の抽出溶媒 (80 mM HEPES-KOH、pH 7.8、200 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、8 mM ジチオスレイトール、(各 0.6 mM の 20 種類の L 型アミノ酸を添加していてもよい)) を加え、ワーリングブレンダーを用い、5,000~20,000 rpm で 30 秒間ずつ 3 回の胚芽の限定破碎を行った。このホモジネートから、
- 10 速遠心機を用いた 30,000×g、30 分間の遠心により得られる遠心上清を再度同様な条件で遠心し、上清を取得した。本試料は、-80℃以下の長期保存で活性の低下は見られなかった。取得した上清をポアサイズが 0.2 μm のフィルター (ニューステラディスク 25 : 倉敷紡績社製) を通し、ろ過滅菌と混入微細塵芥の除去を行った。
- 15 次に、このろ液をあらかじめ溶液 (40 mM HEPES-KOH、pH 7.8、100 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオスレイトール、各 0.3 mM の 20 種類 L 型アミノ酸混液 (タンパク質の合成目的に応じて、アミノ酸を添加しなくてもよいし、標識アミノ酸であってもよい)) で平衡化しておいたセファデックス G-25 カラム (アマシャム ファルマシア バイオテック)
- 20 でゲルろ過を行った。得られたろ液を、再度 30,000×g、30 分間遠心し、回収した上清の濃度を、A_{260nm} が 90~150 (A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.4~1.6) となるように調整した後、下記の透析処理やタンパク質合成反応に用いるまで、-80℃以下で保存した。

実施例 2 コムギ胚芽抽出液からの低分子物質の排除とタンパク質合成反応活性

25 の解析

(1) 透析膜による分画

実施例 1 で調製したコムギ胚芽抽出液は、タンパク質合成に必要な因子 (tR

NA、アミノアシル tRNA 合成酵素、リボソーム、翻訳開始因子、ペプチド鎖伸長因子、翻訳終結因子等) と、それ以外の分子、特にタンパク質合成を特異的、または非特異的に阻害する物質を含んでいるので、これを分子量の違いを利用して分画し、タンパク質合成阻害物質を排除したコムギ抽出液を調製することを試みた。

分画には透析膜を用いた。透析膜は排除分子量 50,000 のスペクトラ/ポア 6 (SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA) を用いた。この排除分子量はタンパク質合成に必要な因子を通さず、それ以下の分子量を有する分子を分画し得るものとして選択した。

- 10 透析に供するコムギ胚芽抽出液は、抽出液 1 として、タンパク質合成反応に用いる液から、ATP、GTP、アミノ酸を含まないもの (全容量の 2/3 容のコムギ胚芽抽出液 (実施例 1 で調製したもの)、30 mM HEPES-KOH, pH 7.6、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオスレイトール、0.380 mM スペルミジン、1000 units/m
- 15 1 リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin)、16 mM クレアチンリン酸、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ)、また抽出液 2 として、抽出液 1 に 1.2 mM の ATP を添加したものを調製した。

透析は、上記のそれぞれの抽出液と、胚芽抽出液を含まない以外は全て同組成の溶液を透析外液として抽出液の 50 倍量を用い、26℃、または 4℃ で 12 時間静置して行った。これらの透析内液 (抽出液) から経時的に試料を取り出し、以下のとおり、タンパク質合成活性と抽出液の安定性を計るものとして遠心による沈殿量を解析した。また、透析膜により排除された成分についても解析した。

(2) 抽出液の安定性の解析

- (1) で透析を行っている抽出液から 1 時間ごとに 12 時間まで試料を取り出し、これを 20,000 × g、20 分間の遠心分離を行った。ここで上清として得られる可溶性画分と沈殿として得られる不溶性画分のそれぞれに含まれるタンパク質量を雄ウシ血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法により測定し

た結果を図 1 に示す。図 1 の (A) は上記抽出液 1 (A T P 無し) によるものであり、(B) は抽出液 2 (A T P 添加) によるものである。また■で表されるグラフは可溶性画分内のタンパク質量を、また●で表されるグラフは不溶性画分内のタンパク質量を示す。タンパク質量は、抽出液 1 m l 当たりのものである。

5 図 1 に示されるように、A T P、G T P、アミノ酸を含まない抽出液 1 においては、透析開始 2 時間後に急激な可溶性タンパク質の低下が観察され、その後ほぼ一定値に達し、透析開始 1 2 時間後の濃度は開始時の 7 7. 5 %であった。不溶性タンパク質の量は逆に増加していることから、この可溶性タンパク質濃度の減少は、主に透析中に生じたタンパク質の不溶化に起因していることがわかった。

10 また、A T P を添加した抽出液 2 においては、可溶性タンパク質濃度の低下曲線からその減少速度は穏やかで、不溶化するタンパク質の割合は低く、1 2 時間後においても 8 5. 3 %が可溶性タンパク質として存在していた。これらの結果より、A T P の添加により透析中のコムギ胚芽抽出液の不溶化が抑えられ、該液の安定性が高まったといえる。

15 (3) A T P 非添加の透析によって生じた不溶性タンパク質、および可溶性タンパク質の分析

上記 (2) で取得した可溶性、および不溶性画分のうち、透析 6 時間、および 1 2 時間のものを S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により分離し、クマシーブリリアントブルー (C B B) 染色した結果を図 2 に示す。図中 (A) は透析内液の試料を、また (B) は透析外液の試料をそれぞれ用いた結果を示す。左端のカラムは分子量マーカーであり、その右側は透析を行う前の抽出液を試料としたもの、また A T P 添加ーが抽出液 1 を、+が抽出液 2 を試料としたものを示す。さらに上記 (2) の遠心分離により得られた分画は、上清と沈殿として示している。

25 図から明らかなように、A T P 非存在下と存在下で可溶性タンパク質 (上清) 成分に顕著な差は認められないが、不溶性画分 (沈殿) においては著しい差異が見られた。A T P 非存在下に生じた不溶性タンパク質中には、分子量 5 0, 0 0

0 前後のタンパク質バンドが複数みられるものの、ATP存在下のそれにはCB陽性のタンパク質バンドが検出されなかった。

透析外液のタンパク質については、透析外液を取得後10%トリクロロ酢酸によって沈殿回収してSDS-PAGE分析を行った。この結果(図2(B))より
5 12時間後の透析外液中に、ゲルの先端部に泳動される分子量14,000前後の微量の低分子が検出された。

また、雄ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として、デンストメーター法で算出した透析外液中のタンパク質量は、透析試料容量1ml当たり7 μ g(ATP存在下)と23 μ g(ATP非存在下)であり、上記(1)で行った透析によ
10 て排除されるタンパク質は、質量ともに両透析条件で有意義な差異は認められなかった。透析前後における可溶性タンパク質量の差は、両実験ともに、不溶性タンパク質と透析膜外に排除されたタンパク質量の和よりも大きいことから、透析中にタンパク質の膜への吸着があることを示している。しかし透析前後のタンパク質バンドの電気泳動パターンに差が見られない(未透析試料と上清タンパク質
15 のバンドを比較)ことから考えて、用いた透析膜が特定のタンパク質分子種を特異的に吸着したものではないことがわかる。

(4) 透析後のコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成活性の測定

上記(2)に記載した透析を0、2、4、6、12時間行ったコムギ胚芽抽出液をそれぞれタンパク質合成に用いた。連続式コムギ胚芽無細胞タンパク質合成
20 の方法は既報(Endo, Y. et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230; Madin, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, 559-564)に従って、一部改変して行った。すなわち、透析膜中に上記透析で調製されたコムギ胚芽抽出物含有液6 μ lを含む蛋白質合成用反応液25 μ l(それぞれ最終濃度で、20mM
25 HEPES-KOH(pH7.6)、95mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、0.380mMスペルミジン(ナカライ・テクトニクス社製)、各0.3mM L型アミノ酸20種類、4mMジチオスレイトール、1.2mM ATP

P (和光純薬社製)、0.25 mM GTP (和光純薬社製)、16 mMクレアチンリン酸 (和光純薬社製)、1 U/ μ l RNase inhibitor (TAKARA社製)、0.5 μ g/ μ l クレアチンキナーゼ (Roche社製)、および翻訳鋳型mRNA (Ω GFP) 1 μ g) を入れ、反応溶液の10倍容量の透析液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6、95 mM酢酸カリウム、2.65 mM酢酸マグネシウム、4 mMジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mMクレアチンリン酸、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ、0.380 mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM)、0.005% NaN_3) に対しての透析系で、反応は26°Cで48時間行った。透析膜は、排除分子量50,000のスペクトラ/ポア6 (SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA) を用いた。

翻訳鋳型となるmRNA (Ω GFP) は、SP6プロモーター配列に連結させた翻訳開始反応配列であるタバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ (Ω) 配列、さらに3' 下流に連結させたGFP遺伝子DNAを含むプラスミドGFP/pEU (WO 01/27260号公報) を鋳型として、SP6 RNA polymerase (TOYOBO社製) を用いて転写を行い、得られたRNAをフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech社製) により精製して用いた。

20 反応終了後の合成反応液中のタンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離とクマシーブリリアントブルーによる染色法と定量法は遠藤らの論文 (Madin, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564 (2000)) に記載した方法によった。GFP活性はTurner Designs社製のTD-360 Mini-Fluorometerを用い添付の手技に従って蛍光強度から定量した。これらの結果を図3に示す。

図から明らかなように、ATP存在下の透析によって得たコムギ胚芽抽出液試

料（白棒グラフ）は、透析時間が長くなるにしたがってタンパク質合成が促進され、透析 1 2 時間では未透析（黒棒グラフ）のその 2 3 6 % に達した。一方、A T P 非存在下で透析したもの（斜線棒グラフ）は、タンパク質合成活性が著しく低下し、透析 1 2 時間では未透析のその 3 7 . 5 % まで低下することが判った。

以上の結果より、低分子合成阻害物質を除外したコムギ胚芽抽出液を用いることによりタンパク質合成活性は著しく上昇するが、低分子合成阻害物質の除外を透析によると、溶液の不溶化によりタンパク質合成活性の低下減少が起こること、またその溶液の不溶化は A T P を添加することにより防止でき、不溶化を防止して透析を行った場合にはタンパク質合成活性が促進されることが判った。次に、透析内液の不溶化現象の機作を分子レベルで理解する第一歩としてコムギ胚芽抽出液成分の内のタンパク質合成の主要因子である R N A に着目し、不溶性画分の成分を解析した。

実施例 3 不溶性画分の解析

15 上記実施例 2（2）で得られた不溶性画分から S D S - フェノール法により核酸を抽出した。この R N A の抽出法、定量法、およびゲル電気泳動による分析は、遠藤らの論文（E n d o , Y . e t a l . , J . B i o t e c h . , 2 5 , 2 2 1 - 2 3 0（1 9 9 2））に記載した方法を用いた。この結果を図 4 に示す。核酸量は紫外線吸収値（A 2 6 0 n m）により測定している。図から明らかなように、

20 A T P 存在下の透析により得られたコムギ胚芽抽出液を用いたもの（図 4 A、■で示すグラフ）には、微量の核酸しか検出されないものの、A T P 非存在下の透析により得られたコムギ胚芽抽出液を用いたもの（図 4 A、●で示すグラフ）では、高濃度の核酸が含まれていた。この核酸を含む溶液の不溶化は、透析開始 4 時間まで続くことから、2 時間より先は一定値を示した（図 1 A 参照）タンパク

25 質の不溶化のカイネチックスとは異なるものであると言える。

さらに、透析 6 時間後のコムギ胚芽抽出液から生じた不溶性物質から抽出した紫外線吸収物質をアガロースゲル電気泳動で分析したところ、この物質の主要成

分がエチジウムブロマイド染色陽性で、マーカーバンドとの移動度から tRNA であることを確認した (図 4 B、レーン (一))。これらの事実から、ATP 非存在下の透析によってタンパク質合成活性が著しく低下する現象は、何らかの機作によって tRNA を含む不溶性物質が生成し、コムギ胚芽抽出液中の tRNA の濃度の特異的な低下に起因するものであると説明できる。未透析試料 1 ml 中には 10 A 260 nm units 程度の tRNA が含まれており、8%未満の tRNA の不溶性物質への移行によって、タンパク質合成が 30%低下 (6 時間透析、図 3) するという事実などを考え合わせると、この不溶性物質に含まれる tRNA は、mRNA 上の特定のコードンを認識する特異な分子種である可能性がある。いずれにしても、ATP は tRNA を含むこのような不溶性物質生成反応において、不溶化防止剤として機能していることが実験結果から確かめられた (+ATP レーン)。細胞内の tRNA、アミノアシル tRNA は遊離の状態で存在しているのではなく、アミノアシル tRNA 合成酵素、5 S rRNA や一部のリボソームタンパク質との複合体構造を形成していることが報告されている (M. Mirande, et al., Eur. J. Biochem. 147, 281-289 (1985); K. Ogata et al., J. Biochem., 110, 1037-1044 (1991))。これらの報告を考え合わせてさらに考察すると、ここに示した実験結果は、それらの複合体形成に ATP が関わっているということを示唆している。そこで、この透析時におけるコムギ胚芽抽出液の不溶化防止・タンパク質合成活性の活性化効果が ATP にのみ特異的な現象か否かについて以下に検討した。

実施例 4 コムギ胚芽抽出液からの透析膜による低分子物質の排除における不溶性物質生成防止因子 (抽出液の安定性誘導因子)、およびタンパク質合成不活化阻害因子の検討

25 (1) 抽出液の安定性誘導因子の解析

実施例 2 (1) で行った透析法で、透析中の不溶性物質の生成を防止する作用が ATP に特異的なものであるかを解析するために、抽出液 3 として、実施例 2

(1) に記載した抽出液 1 に 0.25 mM GTP を添加したもの、抽出液 4 として、抽出液 1 に 20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM) を添加したもの、また抽出液 5 として、抽出液 1 に 1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM) を添加したものを調製した。

- 5 これらの抽出液を用いて、実施例 2 (1) に記載の方法と同様にして透析を 6 時間行い、さらに実施例 3 と同様にして不溶性画分中の核酸の分析を行った。この結果を図 5 (A) に示す。図から明らかなように透析 6 時間後におけるコムギ胚芽抽出液中の核酸 (tRNA) の不溶化の防止に対する GTP 添加の効果 (+ (GTP)) は、ATP のそれ (+ (ATP)) とほぼ同等であり、ATP と GTP
- 10 P に比べると低いもののアミノ酸 (+ (AAs)) にもその効果があることが判った。

(2) 透析後のコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成活性の測定

- 上記実施例 4 (1) で得られたコムギ胚芽抽出液を、実施例 2 (3) と同様にして GFP mRNA を鋳型としたタンパク質合成を行い、蛍光強度から同様にして合成蛋白質量を測定した。この結果を図 5 (B) に示す。GTP (+ (GTP))
- 15 は不溶化防止効果とほぼ一致して、タンパク質合成を ATP (+ (ATP)) とほぼ同等に促進することが判った。しかし、アミノ酸 (+ (AAs)) は一定の tRNA 不溶化防止効果を示すものの、タンパク質合成の活性促進効果はほとんど認められなかった。また、この実験から、ATP、GTP、20 種類のアミノ酸の
- 20 共存下で透析したコムギ胚芽抽出液の不溶性物質 (tRNA) 量が最も低く (図 5 (A) (+ (ATP、GTP、AAs))、同時にタンパク質合成活性が最も高い (図 5 (B) (+ (ATP、GTP、AAs)) が判った。また、透析を 12 時間行ったものでも不溶性物質 (tRNA) の生成は検出されなかった (図 4 C)。

- 以上の結果は、tRNA の不溶化には ATP の他、GTP、アミノ酸も関わっ
- 25 ていることを示すと同時に、これらの不溶化防止効果が透析によるタンパク質合成促進化効果の直接的な原因ではないことをも示している。また、コムギ胚芽抽出液の透析によるタンパク質合成促進化の効果は、ATP、GTP、20 種類ア

ミノ酸の共存下に行うことが最も有効であることが明らかになった。

比較例 1 ATP、GTP、20種類アミノ酸共存下で静置する操作のタンパク質合成活性への効果の検討

実施例 4 に示した ATP、GTP、20 種類アミノ酸の共存下の透析により得
5 られたコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成活性促進の効果が、単に ATP、GTP、20 種類アミノ酸の共存下で静置する操作によるものではないことを確認するために以下の実験を行った。

実施例 4 (1) に記載した抽出液 5 (コムギ胚芽抽出液にタンパク質合成に必要な全ての因子を添加したもの：1. 2 mM ATP、0. 25 mM GTP、
10 20 種類の L 型アミノ酸 (各 0. 3 mM) を添加) を透析と同条件である 26℃で、6 時間にわたり静置した後、実施例 2 (3) と同様にして GFP mRNA を鋳型としたタンパク質合成を行い、蛍光強度から同様にして合成タンパク質量を測定した。この結果を図 6 に示す。図中、●で示されるグラフは上記操作を行った抽出液の結果を示し、○で示されるグラフは上記操作を行っていないもの (従
15 来法) の結果を示す。図から明らかなように、上記操作によっては、タンパク質合成の促進効果は認められず、むしろタンパク質合成活性の低下がみられた。このことは、ATP、GTP、アミノ酸共存下の透析によるタンパク質合成活性の促進は、単にこれらの共存下で静置したことによる効果ではなく、透析膜による低分子物質の除外に起因していると言える。

20 上記操作のタンパク質合成活性に与える効果については、既に、コムギ胚芽抽出液を用いる無細胞タンパク質合成反応が、ATP、GTP、アミノ酸等のタンパク質合成に必要な成分の存在下に、バッチ反応法による 30℃、30 分間静置する操作を行うことによって、タンパク質合成量を著しく高めることができることが報告されている (Y. Shuiliang et al., J. Ferment
25 t. Bioeng. 84, 548-552, (1997))。彼らはその結果を基に、この ATP、GTP、およびアミノ酸の効果が、(i) 開始因子 2・GTP・アミノアシル tRNA 三重複合体 (eIF-2・GTP・aminoacyl-tR

NA) の生成・蓄積、および (i i) 43S 前開始複合体 (43S pre initiation complex) の生成・蓄積に起因すると解釈した。上記実施例で示した結果は、ATP、あるいはGTP単独の存在下においても長時間の透析がタンパク質合成活性を促進させることを実証した。タンパク質合成反応

- 5 開始段階における43S前開始複合体形成反応にはGTPを必要とするが、ATPは必要としないことが知られている。本実験で示したATP単独存在下における透析操作がタンパク質合成活性を促進する事実から考えて、我々の得た知見は既報 (Y. Shuiliang, et al., J. Ferment. Bioeng. 84, 548-552, (1997)) のものとは異なった機作によることを
- 10 示唆している。

実施例5 タンパク質合成活性の透析時温度依存性の検討

実施例2(4)、また実施例4(2)で確認したコムギ胚芽抽出液の透析によるタンパク質合成活性の促進効果について、その温度依存性について解析した。実施例4(1)に記載した抽出液5(コムギ胚芽抽出液にタンパク質合成に必要な

15 全ての因子を添加したもの: 1. 2mM ATP、0. 25mM GTP、20種類のL型アミノ酸(各0. 3mM)を添加)を6時間、26℃と4℃で透析した後、実施例2(3)と同様にしてGFPMRNAを鋳型としたタンパク質合成を行い、蛍光強度から同様にして合成タンパク質量を測定した。また、上記比較例と同様に単に抽出液5を4℃で6時間静置したものもコントロール実験として

- 20 行った。これらの結果を図7に示す。

コントロールの4℃の静置による操作により得られたコムギ胚芽抽出液の結果(●-●)に比べて4℃の透析によっても(○-○)、26℃のそれ(□-□)も約2倍のタンパク質合成活性を保持するに至っている。さらに、透析時の温度は4℃でも26℃と同程度もしくはそれ以上の促進効果を与えることを示している。

- 25 これらの知見は、ATP等の存在下にコムギ胚芽抽出液を長時間透析した場合に見られるタンパク質合成活性の促進現象には、生化学的反応ではなく、透析膜の物理的効果(低分子合成阻害物質の除外)が直接的に関与していることが判る。

すなわち、タンパク質合成活性の促進現象は、コムギ胚芽抽出液中には低分子性の翻訳阻害もしくは非特異的な妨害物質が存在しており、透析処理によってこれらが翻訳因子群から排除されることに起因していることが証明された。他方、A T P等の非存在下、4℃における透析を行うと不溶性物質が生成する。このこ
5 とは、4℃においてもA T P等が翻訳因子の安定化、特に長時間の安定化に重要であることを示している。

A T Pの存在下でコムギ胚芽抽出物を長時間透析した場合におけるタンパク質合成活性の促進効果はどのような原理に基づいて生ずるのであろうか。本発明者は上記の実施例で、(i) A T Pの存在下と非存在下の透析によって得られる可溶
10 性のコムギ胚芽抽出物のタンパク質分子種に顕著な差異が見られないこと(図2 Aに示した結果)や、(i i) 4℃の透析によってもタンパク質合成活性の促進効果が確認できること(図7)を示した。これらの知見は、コムギ胚芽抽出液には低分子性の翻訳反応の阻害または妨害物質が存在していることを示唆している。

実施例6 低分子合成阻害物質のタンパク質合成活性への影響の解析

15 実施例1に記載した30,000×gの遠心上清として得られるコムギ胚芽抽出液中には、未同定物質も含めた多種類の低分子物質が存在している。実際、黄色を呈する高濃度の低分子物質が含まれていることが目視によっても確認することができる。通常、アミノ酸やヌクレオチド類などの低分子物質を排除する目的で遠心上清のゲルろ過操作を行った。しかし、既報のいずれの方法(M a d i n,
20 K. e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A (2000), 97, 559-564、特開2000-236896号公報等)においても、そのような低分子物質を完全に排除することを目的とした積極的な試みはなされていない。すなわち、そのような観点から低分子画分中のタンパク質合成阻害作用を調べた研究はなされていないのである。そこで、この可能性を検討する目的で
25 以下の実験を行った。

すなわち、実施例1と同様にワーリングブレンダーで限定破碎したコムギ胚芽試料400μlを30,000×gで遠心分離し、得られた上清を4ml容量の

セファデックス G 25 カラムでゲルろ過を行い、カラムに保持された低分子画分 (分子量 5,000 以下の物質を含む) を溶出し再度同様にゲルろ過操作を行い、分画した黄色い低分子物質画分を得た。これを凍結乾燥後、40 μ l の 10 mM HEPES-KOH, pH 7.6 に溶解し、バッチ方式無細胞タンパク質合成系 5 (反応総容量 80 μ l) に添加した。

すなわち、あらかじめ実施例 2 (1) に記載の方法と同様にして ATP 存在下に 1.2 時間透析しておいたコムギ胚芽抽出液を含むタンパク質合成溶液 (GFP mRNA を鋳型として) を用いて、低分子物質のタンパク質合成に対する影響をバッチ反応法によって調べた。反応溶液の調製および反応方法は既報 (Madin, K. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564 (2000)) に従って、これを一部改変して行った。反応溶液としては、30 mM HEPES-KOH, pH 7.6、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.5 mg/ml 15 クレアチンキナーゼ、0.380 mM スペルミジン、20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM) 1000 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin) を含む溶液を用いた。実施例 2 (4) に記載の GFP mRNA として、60 μ g/ml 添加し、26 $^{\circ}$ C で合成反応を行った。

この結果を図 8 に示す。図の横軸は添加した黄色い低分子画分の容量である。20 タンパク質合成活性は 26 $^{\circ}$ C、2 時間に [14 C] -ロイシンのタンパク質へ取り込まれた放射能カウントから測定した。ここでは、反応液 5 μ l 中のタンパク質に取り込まれた放射能カウントが 3600 dpm を 100% とした。

図 8 に示されるように、この黄色物質を含む低分子物質画分の添加量に応じて、タンパク質合成が強く阻害されることが判る。すなわち、阻害機作は不明である 25 がタンパク質合成活性阻害因子がコムギ胚芽抽出液に含まれる低分子画分に存在することが明らかとなった。ここで得た知見と、上記のタンパク質合成活性促進現象などの実験結果を考え合わせると以下のように説明が成り立つ。すなわち、

不溶化防止剤としてのATP等の存在下にコムギ胚芽抽出液を透析することによって、低分子性のタンパク質合成阻害因子が透析膜を介してこれから排除される結果としてタンパク質合成活性が上昇する、というものである。この考え方に立つと透析過程におけるATP、GTP、20種類アミノ酸による不溶化防止効果（tRNAの不溶化）と、透析によるタンパク質合成促進効果が独立した現象であることが説明可能となる。

コムギ胚芽抽出液からの低分子のタンパク質合成阻害物質の排除機構に関しては、透析外液への移行のみでなく、透析膜への吸着による排除もあげられる。ここで示したタンパク質合成阻害物質は、セファデックスG25カラムの吸着画分に含まれ、また、排除分子量50,000ダルトンのスペクトラ／ポア6もしくは排除分子量12,000～14,000ダルトンの再生セルロース膜によって排除される物質も含まれるため、分子量14,000ダルトン程度よりも小さい物質であると考えられる。

実施例7 鋳型以外のタンパク質合成に必要な成分を全て含有したコムギ胚芽抽出液の検討

15 出液の検討

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成反応液はキット化された種々の製品が既に販売されている。しかし、これらのすべての製品はコムギ胚芽抽出液とアミノ酸、エネルギー源やイオン等を含む溶液が別々の容器に収められており、タンパク質合成反応に当たってはその都度にそれらの成分を目的に合わせて鋳型とともに混合する必要があった。これらの混合操作は0～4℃程度の低温で行う必要があること等から煩雑であり、合成反応の失敗の原因となってきた。さらにこのようなタンパク質合成反応キットの構成では、多数の遺伝子からのタンパク質の網羅的合成には不向きであり、将来の全自動ロボット化に向けてこのような煩雑なプロセスは解決しなければならない最大の課題の一つであった。

25 実施例4（1）に記載した抽出液5は、コムギ胚芽抽出物に加えてATP、GTP、アミノ酸を含むものであり、これらの共存下で透析を行うことによって、従来よりも遥かに高いタンパク質合成能が高まったコムギ胚芽抽出液を調製する

ことができた (図 5 B)。このことから、透析に先だってそれぞれの構成成分の濃度をコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成の至適濃度に合わせておいた試料を用いれば、透析後にその溶液に mRNA を添加する操作だけで、無細胞タンパク質合成を簡便に実施することが出来るはずである。

- 5 実施例 1 の方法によって取得された 3 種類のロットのコムギ胚芽抽出液を実施例 4 (1) に記載した抽出液 5 の組成に調製し、これを用いて実施例 2 (1) に記載の方法により 12 時間の透析を行った。この抽出液を用いて実施例 2 (4) に記載の方法と同様にして GFP mRNA を鋳型として、透析膜を用いる連続法によって、透析、未透析のコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成活性を測定した。
- 10 この結果を図 9 に示す。図 9 A はタンパク質合成反応 48 時間後の試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した結果を示したが、矢印が示すマシーブリリアントブルー染色バンドが生産物の GFP である。A、B、C のいずれのロットの抽出液を用いても、透析処理したコムギ胚芽抽出液 (透析処理 (+)) を用いて合成された GFP 量が、透析処理していないコムギ胚芽抽出液 (透析処理 (-)) と比べて明らかに増大していることが分かる。精製 GFP 標品を基準としてデンストメーターによって算出した反応液 1 ml 当たりのタンパク質合成量を図 9 B のグラフに示した。透析処理 (■-■) したものでは未透析処理のそれ (●-●) に比べて、ほぼ 2 倍の合成能をもつことが分かる。さらに GFP のもつ蛍光強度から合成産物の活性を測定した結果、透析処理 (□-□)、未処理 (○-○) のコムギ胚芽抽出液ともに、同様の比酵素活性を与える性能を保持していることが確認できた。すなわち、本透析操作によって、合成産物の高次構造体化能が低下することはないことを示している。
- 20

さらに、このようにして調製した高機能のコムギ胚芽抽出液を -80℃ で 4 週間以上保存した後において、同様のタンパク質合成活性の解析を行ったところ、

- 25 調製直後のものと比べて該活性の低下は見られなかった。また、透析処理、および連続方式タンパク質合成に用いる透析膜として、排除分子量 50,000 ダルトンのスペクトラ/ポア 6 の代わりに、排除分子量 12,000~14,000

ダルトンの再生セルロース膜を用いてもほぼ同様の実験結果を得ることができた。

産業上の利用可能性

本発明により無細胞タンパク質合成系に用いられる細胞抽出液から低分子のタンパク質合成阻害物質が排除され、タンパク質合成活性が促進された細胞抽出液
5 を取得することができる。また、細胞抽出液から低分子阻害物質を排除する工程を、タンパク質合成に必要な成分のうち翻訳鋳型を除く全ての存在下で行うことによりレディーメイド型細胞抽出液が提供される。

本出願は、日本で出願された特願 2 0 0 2 - 2 3 1 4 1 を基礎としておりそれ
10 らの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. タンパク質合成活性を有し、且つ低分子のタンパク質合成阻害物質を含まないことを特徴とする、細胞抽出液。

5

2. 低分子のタンパク質合成阻害物質が、排除分子量12,000～14,000ダルトンの再生セルロース膜を用いた透析によって除去され得るものである、請求の範囲1記載の細胞抽出液。

10 3. 低分子のタンパク質合成阻害物質が分子量14,000ダルトン以下のタンパク質合成阻害物質である、請求の範囲1記載の細胞抽出液。

4. 不溶性物質を実質的に含まない請求の範囲1～3のいずれか1項に記載の細胞抽出液。

15

5. 細胞抽出液がコムギ胚芽抽出液であることを特徴とする請求の範囲1～4のいずれか1項に記載の細胞抽出液。

6. タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から低分子のタンパク質合成阻害物質を排除することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造方法。

20

7. 低分子のタンパク質合成阻害物質が、排除分子量12,000～14,000ダルトンの再生セルロース膜を用いた透析によって除去され得るものである、請求の範囲6記載の方法。

25

8. 低分子のタンパク質合成阻害物質が分子量14,000ダルトン以下のタンパク質合成阻害物質である、請求の範囲6記載の方法。

9. 細胞抽出液がコムギ胚芽抽出液であることを特徴とする請求の範囲6～8のいずれか1項に記載の方法。

5 10. タンパク質合成阻害物質の排除が、透析により行われることを特徴とする請求の範囲6～9のいずれか1項に記載の方法。

11. タンパク質合成阻害物質の排除が、少なくとも高エネルギーリン酸化合物を含む溶液中で行われることを特徴とする請求の範囲6～10のいずれか1項に記載の方法。

12. タンパク質合成阻害物質の排除が、翻訳鋳型を除く無細胞タンパク質合成に必須の成分を含む溶液中で行われることを特徴とする請求の範囲6～11のいずれか1項に記載の方法。

15

13. タンパク質合成に必須の成分が、無細胞タンパク質合成反応を行い得る濃度で溶液中に含まれていることを特徴とする請求の範囲12記載の方法。

14. 請求の範囲6～13のいずれか1項に記載の方法によって製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液。

15. 請求の範囲1～5、および14のいずれか1項に記載の細胞抽出液を用いることを特徴とするタンパク質合成方法。

25 16. 少なくとも請求の範囲1～5、および14のいずれか1項に記載の細胞抽出液を含むことを特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット。

17. 請求の範囲15に記載の方法または請求の範囲16に記載のキットを用いることによって取得されたタンパク質。

図 1

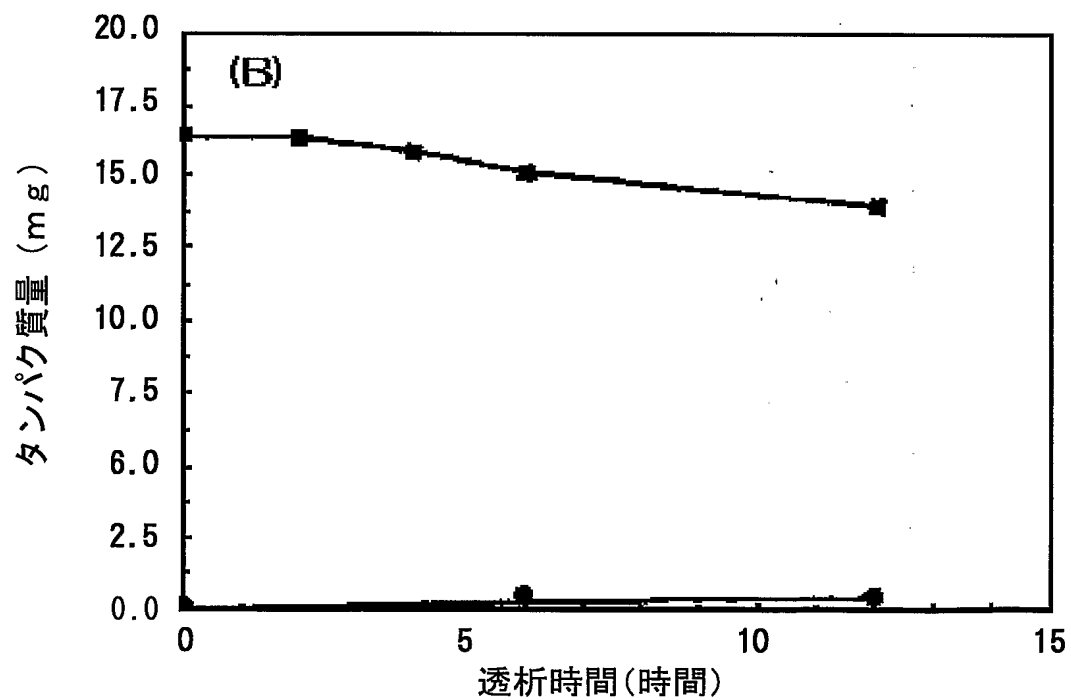
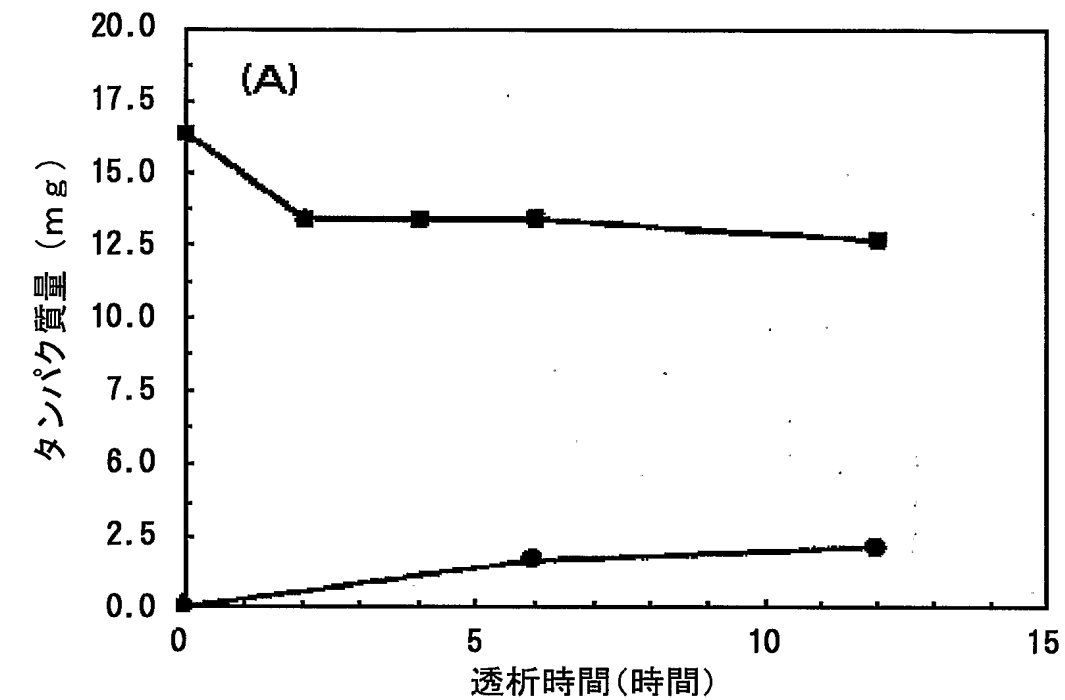


図 2

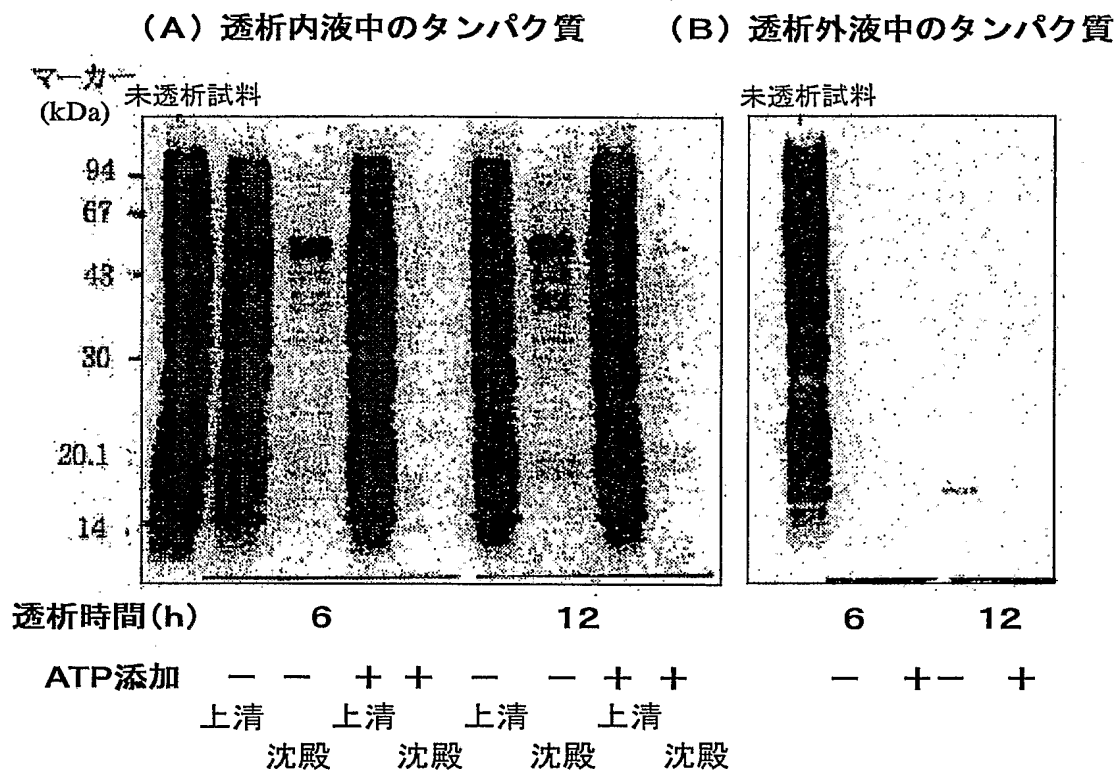


図 3

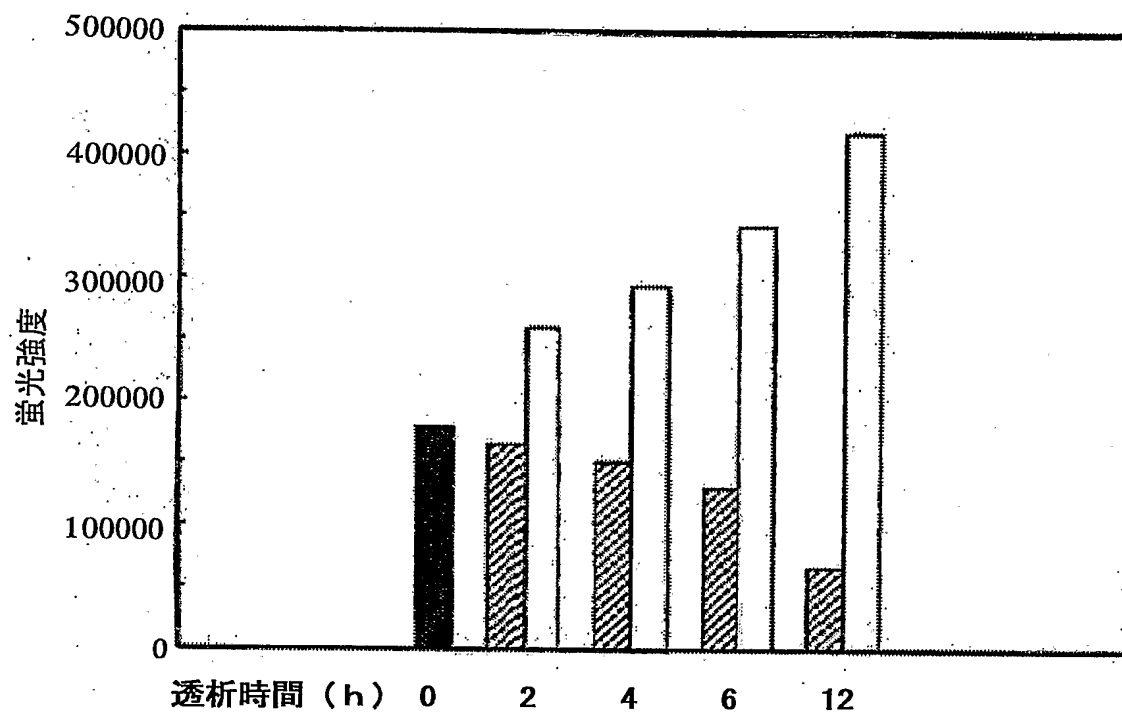
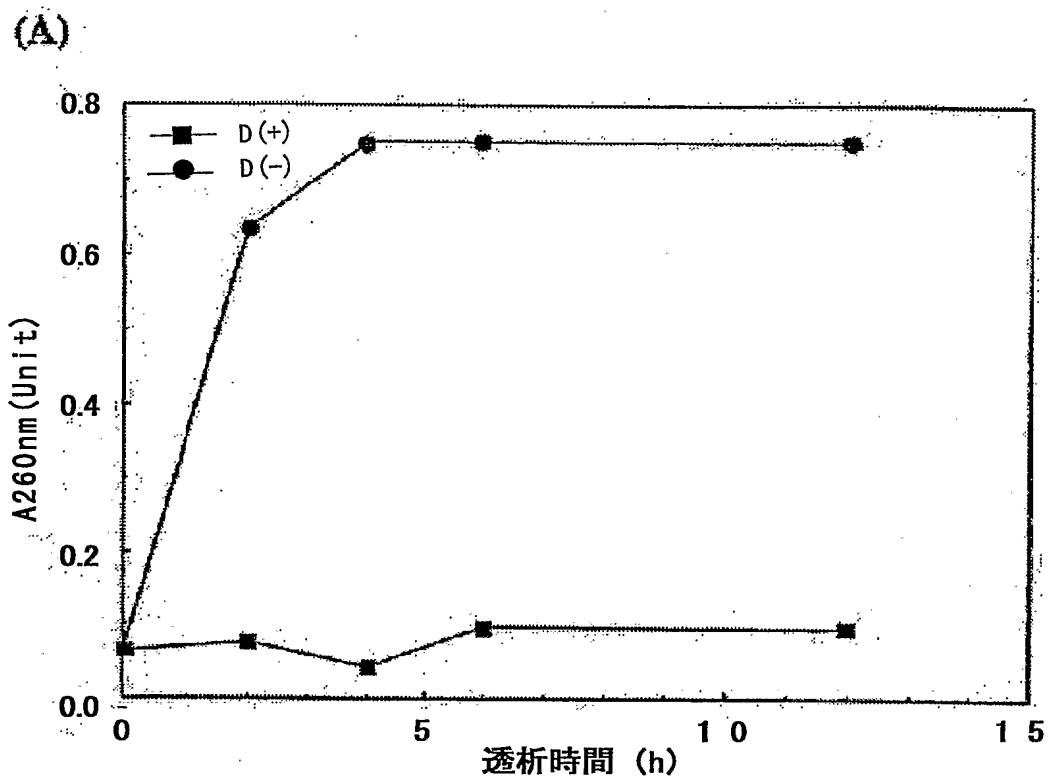
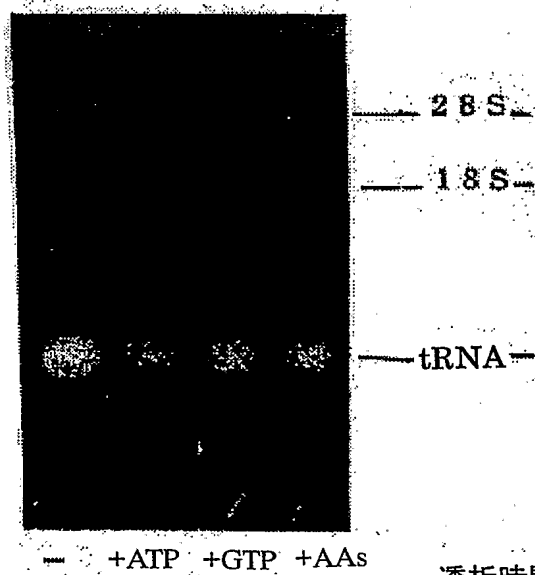


図 4



(B)



(C)

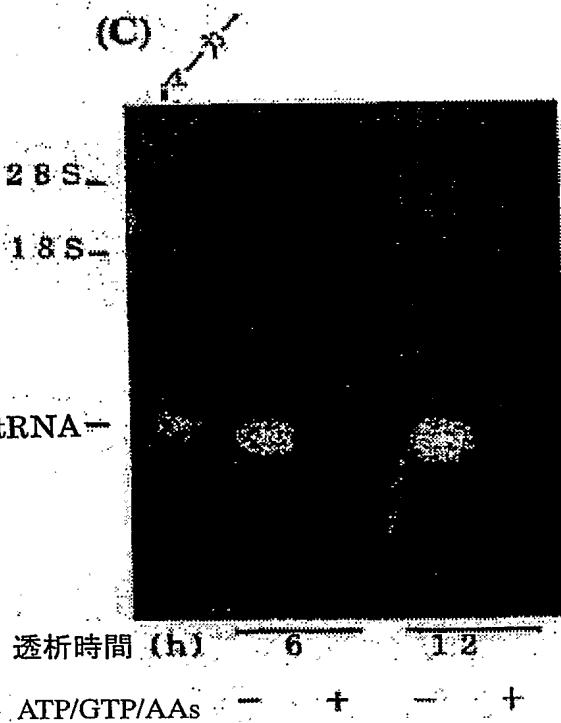


図 5

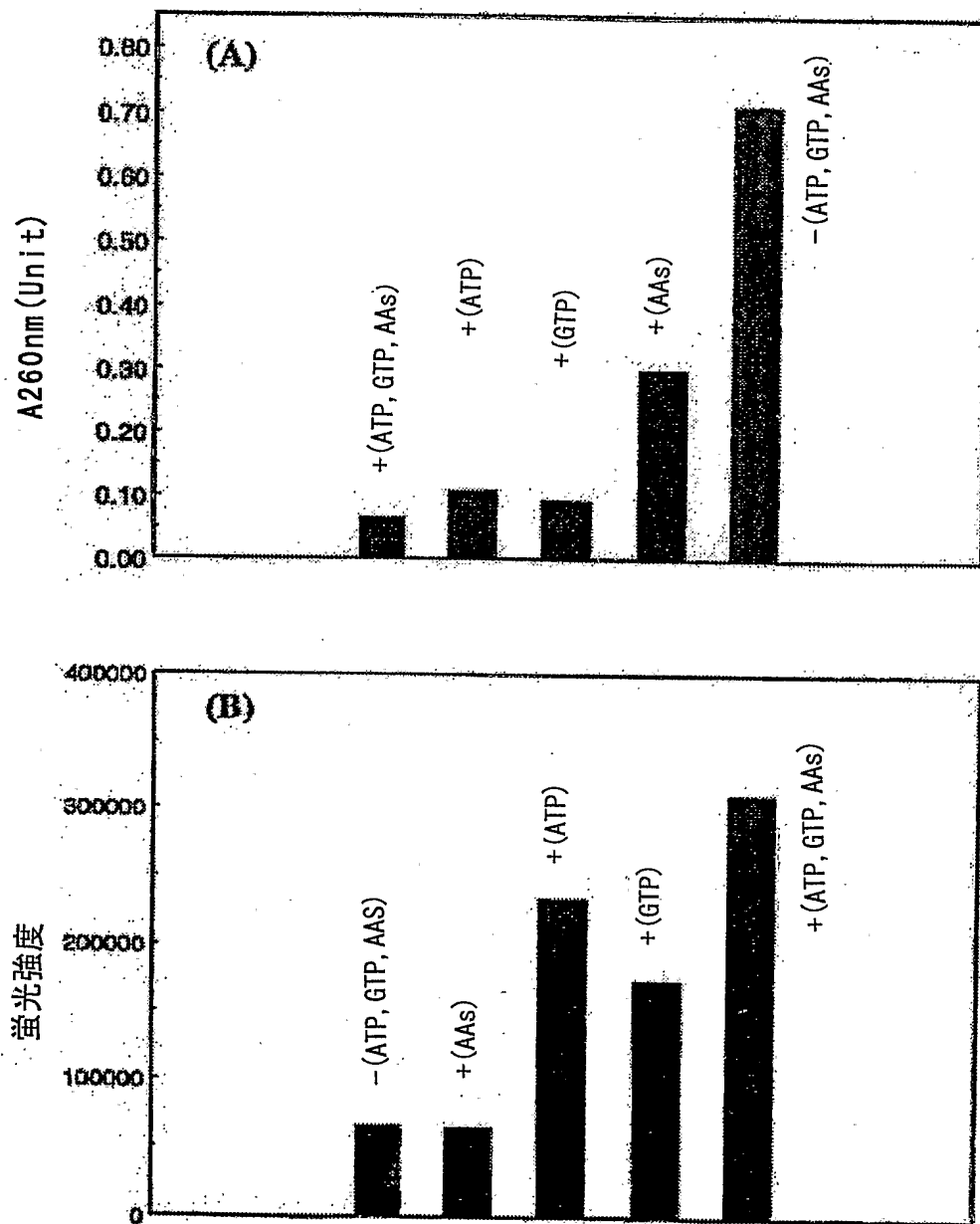


図 6

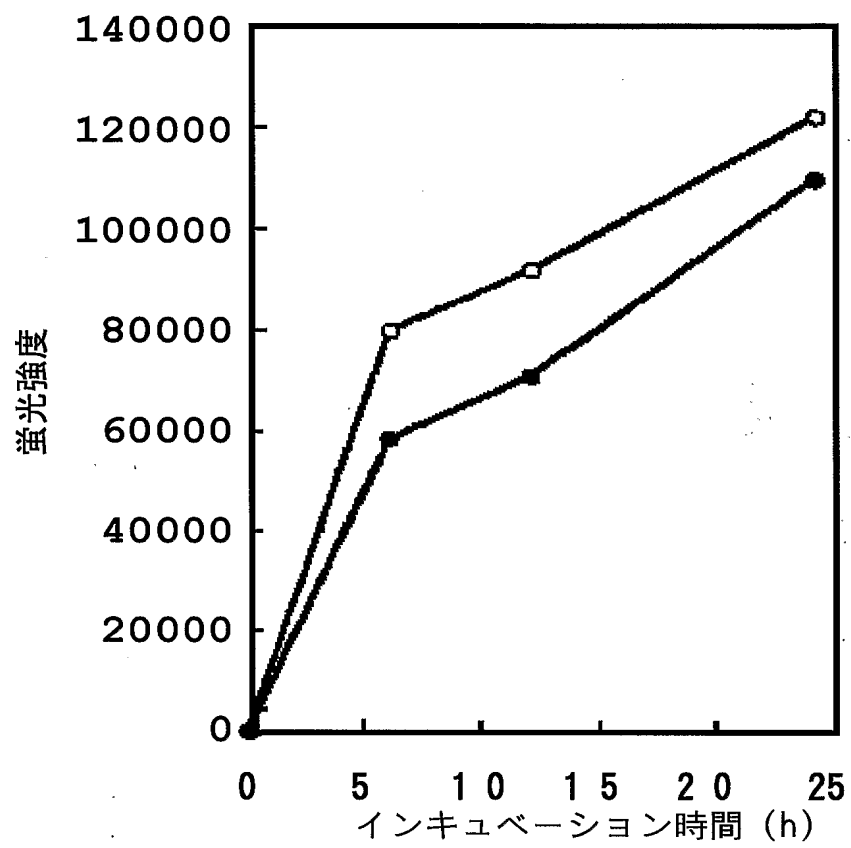


図 7

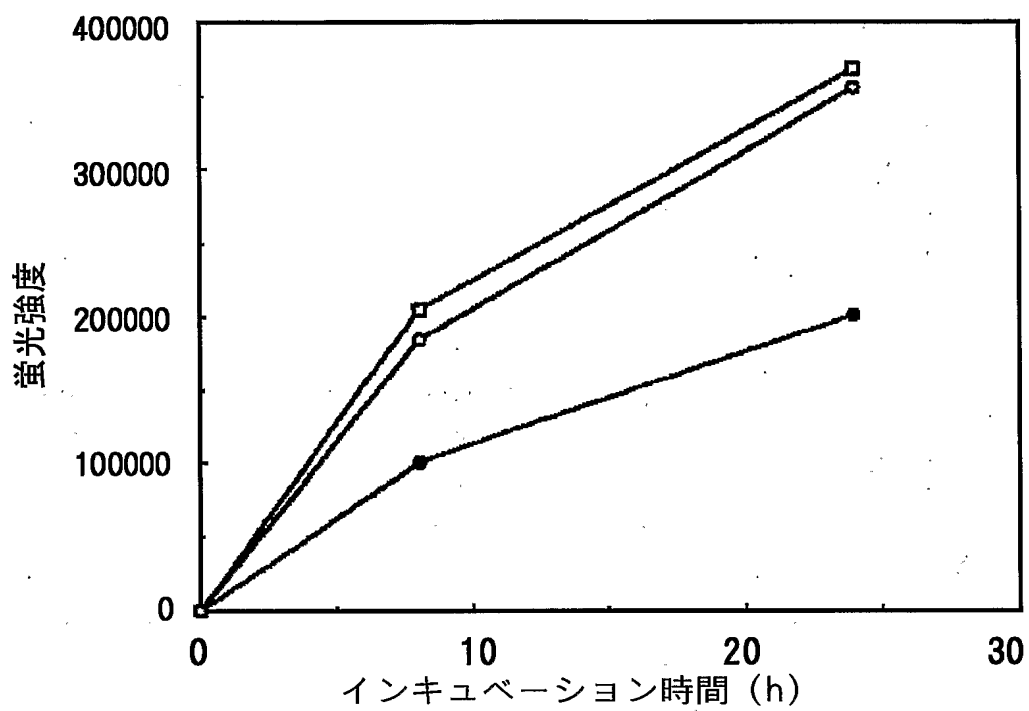


図 8

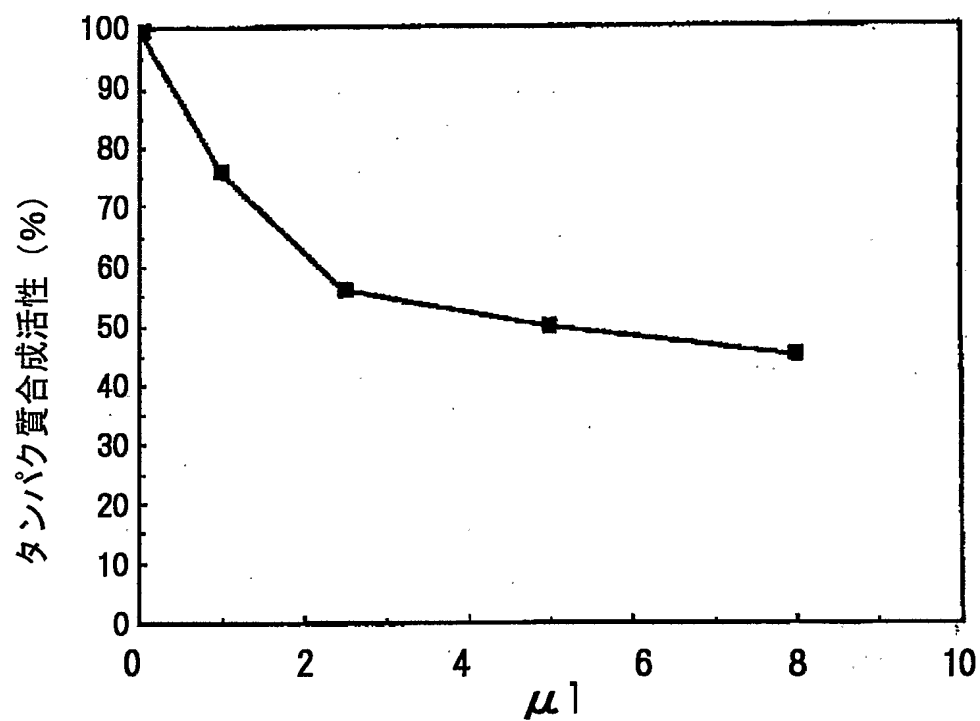
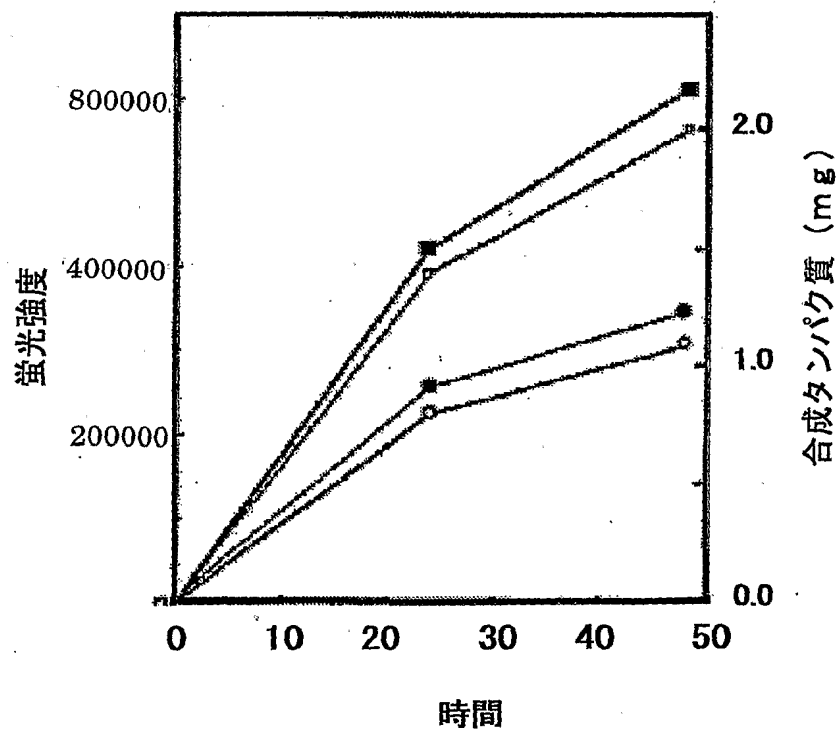
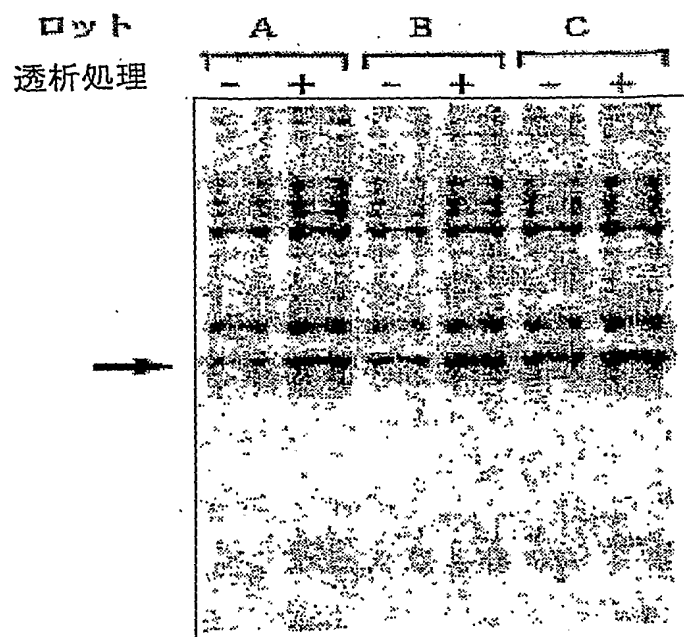


図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12P21/02, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12P21/02, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------------------|
| X | NAKANO, H. et al., "An increased of cell-free protein synthesis by condensing wheat-germ extract with ultrafiltration membranes", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, (1994), Vol.58, No.4, pages 631 to 634, particularly, page 632, left column, Par. No. [0005] to right column, Par. No. [0001]; Fig. 4; page 634, right column, Par. No. [0003] | 1-16 |
| X | KIGAWA T. et al., "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities", FEBS LETTERS, (1999), Vol.442, No.1, pages 15 to 19, particularly, pages 15 to 16, paragraphs 2.2 to 2.3; Fig. 2 | 1-4, 6-8, <u>10-16</u> 5, 9 |
| Y | | |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2003 (14.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00975

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|---------------------------|
| X | Madin, K. et al., "A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, (2000), Vol.97, No.2, pages 559 to 564, particularly, page 564, left column, line 3 to right column, Par. No. [0002] | 1-16 |
| X | EP 593757 A1 (INSTITUT BELKA AKADEMII NAUK SSSR), | 1-4, 6-8, <u>10-16</u> |
| Y | 27 April, 1994 (27.04.94), Examples 1 to 5 & WO 91/02076 A1 & SU 1839191 A1 & CA 2064754 A & JP 7-508158 A & US 6399323 B1 & US 5478730 A | <u>5, 9</u> |
| X | EP 485608 A1 (INSTITUT BELKA AKADEMII NAUK SSSR), | 1-4, 6-8, <u>10-16</u> |
| Y | 20 May, 1992 (20.05.92), Particularly, column 2, lines 9 to 19; examples 1 to 2 & WO 91/02075 A1 & CA 2064685 A & JP 5-505095 A & US 5478730 A | <u>5, 9</u> |
| X | Szybiak, U. et al., "Control of protein synthesis in a wheat germ cell-free system", ACTA BIOCHIMICA POLONICA, (1983), Vol.30, Nos. 3 to 4; pages 225 to 263, particularly, page 255, Par. No. [0001] to page 256, Par. No. [0001]; page 260. Par. No. [0001] | 1-16 |
| Y | Kim, D.M. et al., "Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, (2000), Vol.16, No.3, pages 385 to 390, abstract | <u>12</u> |
| A | KAWARASAKI, Y. et al., "Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (1998), Vol.61, No.3, pages 199 to 208 | 1-11, 13-16 |
| A | | 1-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00975

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 17

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The protein as set forth in the above claim is defined exclusively by the point of being synthesized by a specific synthesis system. However, it cannot be preliminarily understood what structural characteristics is observed in common to the proteins as defined above. Thus, (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00975

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

the scope of the above claim is unclear. Such being the case, the above claim does not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out (PCT Article 17(2)(a)(ii)).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P21/02, C12N15/00

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P21/02, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|--------------------|
| X | Nakano, H. et al., "An increased rate of cell-free protein synthesis by condensing wheat-germ extract with ultrafiltration membranes" BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, (1994), Vol.58, No.4, pp.631-634, 特にp.632左欄第5段落-右欄第1段落, Fig.4及びp.634右欄第3段落参照 | 1-16 |
| X | Kigawa, T. et al., "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities" FEBS LETTERS, (1999), Vol.442, No.1, pp.15-19, 特にp.15-16の段落2.2-2.3及びFig.2参照 | 1-4, 6-8, 10-16 |
| Y | | 5, 9 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.04.03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | Madin, K et al., "A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, (2000), Vol.97, No.2, pp.559-564, 特にp.564左欄第3-右欄第2段落参照 | 1-16 |
| X — Y | EP 593757 A1 (INSTITUT BELKA AKADEMII NAUK SSSR), 1994.04.27, 実施例1-5参照, & WO 91/02076 A1 & SU 1839191 A1 & CA 2064754 A & JP 7-508158 A & US 6399323 B1 & US 5478730 A | 1-4, 6-8, <u>10-16</u> 5, 9 |
| X — Y | EP 485608 A1 (INSTITUT BELKA AKADEMII NAUK SSSR), 1992.05.20, 特に第2欄第9-19行及び実施例1-2参照 & WO 91/02075 A1 & CA 2064685 A & JP 5-505095 A & US 5478730 A | 1-4, 6-8, <u>10-16</u> 5, 9 |
| X | Szybiak, U. et al., "Control of protein synthesis in a wheat germ cell-free system" ACTA BIOCHIMICA POLONICA, (1983), Vol.30, No.3-4, pp.255-263, 特にp.255第1段落-p.256第1段落, p.260第1段落 | 1-16 |
| <u>Y</u> A | Kim, D.M. et al., "Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, (2000), Vol.16, No.3, pp.385-390, 要約参照 | <u>12</u> 1-11, 13-16 |
| A | Kawarasaki, Y. et al., "Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (1998), Vol.61, No.3, pp.199-208, | 1-16 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 17 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
上記請求の範囲に記載のタンパク質は、特定の合成系により合成されるという点によってのみ定義されているが、上記定義に含まれるべきタンパク質全般がいかなる構造的特徴を有するか事前に把握し得ないため、前記請求の範囲は明瞭ではない。したがって、上記請求の範囲は有意義な国際調査をなし得る程度にまで所定の要件を満たしていない。(PCT17条(2)(a)(ii))
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。